

日本国

JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 03 MAR 2003

特許庁

PCT/JP02/13757

27.12.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年12月27日

出願番号

Application Number:

特願2001-397523

[ST.10/C]:

[JP2001-397523]

出願人

Applicant(s):

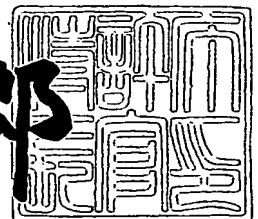
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3005927

【書類名】	特許願
【整理番号】	A5309
【提出日】	平成13年12月27日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C07K 14/705
	C07K 16/28
	C07H 21/00
	C12N 15/09
	C12P 21/02
	A61K 38/17
	A61K 39/395
	A61K 48/00
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製 薬株式会社内
【氏名】	須軽 英仁
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製 薬株式会社内
【氏名】	山中 貢
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製 薬株式会社内
【氏名】	市原 準二
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製 薬株式会社内
【氏名】	泰地 睦夫

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712367

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 拒食症又は生活習慣病治療薬及びそのスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの発現もしくは機能を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)の核酸：

(a) 配列番号1又は3記載の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸

(b) 配列番号1又は3記載の塩基配列からなる核酸もしくは転写後プロセッシングにより該塩基配列を生じる初期転写産物と、治療対象動物の視床下部の生理的条件下でハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つハイブリダイズした状態で該配列番号1又は3記載の塩基配列にコードされるポリペプチドの翻訳を阻害し得る核酸

を有効成分とする拒食症治療薬。

【請求項3】 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的親和性を示し、該ポリペプチドの機能的発現を阻害する物質を有効成分とする拒食症治療薬。

【請求項4】 該物質が核酸である請求項3記載の拒食症治療薬。

【請求項5】 該物質が抗体である請求項3記載の拒食症治療薬。

【請求項6】 請求項2又は4記載の核酸をコードする発現ベクターを有効成分とする拒食症治療薬。

【請求項7】 請求項6記載の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を有効成分とする拒食症治療薬。

【請求項8】 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの発現もしくは機能を増強する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬。

【請求項9】 以下の(a)～(c)のいずれかのポリペプチド：

(a) 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加または修飾されたアミノ酸配列からなり、(a)のポリペプチドと同等のリガンド-受容体相互作用を示し、且つG蛋白質 α サブユ

ニットと共役して該サブユニットのGDP・GTP交換反応を促進する活性を有するポリペプチド

(c) (a) のポリペプチドのオルソログであるポリペプチドを有効成分とする生活習慣病治療薬。

【請求項10】 請求項9記載のポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを有効成分とする生活習慣病治療薬。

【請求項11】 請求項10記載の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を有効成分とする生活習慣病治療薬。

【請求項12】 摂食抑制剤、抗肥満剤、抗糖尿病剤又は抗高脂血症剤である請求項8～11のいずれかに記載の生活習慣病治療薬。

【請求項13】 拒食症又は生活習慣病に対する治療活性を有する物質のスクリーニング系であって、以下の(a)～(c)のいずれかのポリペプチド：

(a) 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号2又は4記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加または修飾されたアミノ酸配列からなり、(a)のポリペプチドと同等のリガンド-受容体相互作用を示し、且つG蛋白質 α サブユニットと共役して該サブユニットのGDP・GTP交換反応を促進する活性を有するポリペプチド

(c) (a) のポリペプチドのオルソログであるポリペプチドを含む脂質二重層膜、並びにあるファミリーに属するG蛋白質 α サブユニットの受容体結合領域及び任意のG蛋白質 α サブユニットのグアニンヌクレオチド結合領域を少なくとも含むポリペプチドを構成要素として含む系を1構成単位とし、該構成単位をG蛋白質 α サブユニットの各ファミリーの受容体結合領域について有することを特徴とするスクリーニング系。

【請求項14】 該構成単位が、該(a)～(c)のいずれかのポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターと、あるファミリーに属するG蛋白質 α サブユニットの受容体結合領域及び任意のG蛋白質 α サブユニットのグアニンヌクレオチド結合領域を少なくとも含むポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターとでトランスフェクトした宿主動物細胞、該細胞のホモジネートま

たは該細胞由来の膜画分である、請求項 1 3 記載のスクリーニング系。

【請求項 1 5】 該構成単位が、該 (a) ~ (c) のいずれかのポリペプチドの C 末端側に、あるファミリーに属する G 蛋白質 α サブユニットの受容体結合領域及び任意の G 蛋白質 α サブユニットのグアニンヌクレオチド結合領域を少なくとも含むポリペプチドが融合したポリペプチドをコードする DNA を含む発現ベクターでトランスフェクトした宿主動物細胞、該細胞のホモジネートまたは該細胞由来の膜画分である、請求項 1 3 記載のスクリーニング系。

【請求項 1 6】 各構成単位の、G 蛋白質 α サブユニットの受容体結合領域及び任意の G 蛋白質 α サブユニットのグアニンヌクレオチド結合領域を含むポリペプチドが、同一の効果器相互作用領域をさらに含み、且つ該脂質二重層膜が該領域と相互作用する効果器をさらに含むものである、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれかに記載のスクリーニング系。

【請求項 1 7】 生活習慣病に対する治療活性が、摂食抑制活性、抗肥満活性、抗糖尿病活性又は抗高脂血症活性である請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれかに記載のスクリーニング系。

【請求項 1 8】 請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれかに記載のスクリーニング系の各構成単位において、被験物質の存在下及び非存在下で、標識した GTP アナログを添加し、グアニンヌクレオチド結合領域に結合した標識量を両条件下で比較することを特徴とする、拒食症又は生活習慣病に対する治療活性を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 9】 請求項 1 6 記載のスクリーニング系の各構成単位における効果器の活性を、被験物質の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、拒食症又は生活習慣病に対する治療活性を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 0】 生活習慣病に対する治療活性が、摂食抑制活性、抗肥満活性、抗糖尿病活性又は抗高脂血症活性である請求項 1 8 又は 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】 請求項 1 8 又は 1 9 記載の方法により得られる、拒食症に対する治療活性を有する物質を有効成分とする拒食症治療薬。

【請求項 2 2】 請求項 1 8 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法により得られる、生活習慣病に対する治療活性を有する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、視床下部で発現するオーファンGPCRの発現又は機能を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬に関する。詳細には、本発明は、該GPCR mRNAのアンチセンス核酸、該核酸を含む発現ベクターもしくは該発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を有効成分とする拒食症治療薬、あるいは該GPCRに対してアンタゴニスト活性を有する物質を有効成分とする拒食症治療薬に関する。さらに、本発明は、該GPCR及びG蛋白質の共発現系及びそれを用いた拒食症治療活性化化合物のスクリーニング方法に関する。本発明はまた、該GPCRの発現又は機能を増強する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬に関する。詳細には、本発明は、該GPCRに対してアゴニスト活性を有する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬に関する。さらに、本発明は、該GPCR及びG蛋白質の共発現系及びそれを用いた生活習慣病治療活性化化合物のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、食生活の西洋化や社会的ストレスの増加等により、肥満とそれに付随する生活習慣病、特にII型糖尿病患者の増加が著しい。本症例の治療には、はじめに運動療法や食事療法が行われるが、本療法によっても体重コントロールが不十分な場合には薬物療法が行われる。この際、摂食量と体重、血糖コントロールが良好で、かつ安全な治療薬が望まれている。

【0003】

一方、現代のストレス社会は、安易なダイエットの流行とも相まって、思春期の女性を中心に拒食症のような心因性の摂食障害の急増をもたらしている。これらの病気を根本的に治療するには、心理的な問題を解決することが不可欠であるが、サポート的な治療として摂食行動を強制的にコントロールするための薬物療法が施されることもある。この場合の治療薬も、体重や血糖値をコントロールし

ながら摂食を促進し得るものであることが要求される。

【 0 0 0 4 】

摂食のコントロールは主に中枢神経系で行われており、特に視床下部には、食欲等の人間の本能的な行動を支配する神経系が多く存在している。実際に、ラットの視床下部腹内側核を破壊すると過食と肥満をもたらし、一方、視床下部外側核を破壊すると摂食行動を行わなくなる。また、これまでに、摂食調節にかかわるレプチン、神経ペプチド Y (NPY) 等の神経ペプチドの受容体が視床下部に局在することが示されており、このことから視床下部が摂食行動に重要な器官であることは明白である。

【 0 0 0 5 】

視床下部をはじめとする中枢神経系における生理活性物質の受容体、特に G 蛋白質共役型レセプター (GPCR) が、摂食行動と相関することが明らかとなっている。例えば、セロトニン 5-THT₂C レセプターのノックアウト (KO) マウスは慢性的な過食をきたすことが知られている。また、メラノコルチン 4 レセプターのアンタゴニストは摂食を増加させ、逆に、NPY Y5 レセプターのアンタゴニストは摂食を抑制する。

【 0 0 0 6 】

従って、視床下部の神経系を刺激することは摂食行動等に影響を及ぼすものと考えられ、視床下部で発現する GPCR を介したシグナル伝達を、低分子化合物を用いて代替的に操作することは、摂食量と体重、血糖値等をコントロールするという上記の目的にかなうものである。しかし、このような作用機序を持つ薬剤は現在のところ上市されておらず、このような薬剤の開発が大いに望まれるところである。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、外的因子、特に摂食行動に関わる GPCR の発現もしくは機能を抑制あるいは促進する因子を作用させることによって、摂食行動を調節し、もって過食、肥満症を主因とする生活習慣病、あるいは拒食症を治療する手段を提供することである。また、本発明の別の目的は、過食もしくは拒食と

いった摂食障害、肥満症等の調節作用を有する化合物、並びにそのような化合物のスクリーニング方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するために、本発明者らはまず、視床下部に発現する受容体をコードする遺伝子につき検討した結果、あるオーファンGPCR（以下、GPRC5Dという）の遺伝子が肥満モデルマウスの視床下部に発現していることを見出した。そこで、本発明者らは、当該受容体をコードするmRNAのアンチセンスオリゴDNAを肥満モデルマウスに投与してその発現を阻害したところ、実際に摂餌量が増加し、また血糖値が上昇した。このことから、GPRC5Dは摂食行動を負に調節するシグナル伝達に関与する受容体であること、従って、この受容体の発現もしくは機能を阻害する物質は、拒食症のような摂食障害に対して治療効果を発揮することが明らかとなった。また反対に、この受容体の発現もしくは機能を増強する物質は、過食、肥満等に由来するII型糖尿病をはじめとする生活習慣病に治療効果を発揮するはずである。そこで、本発明者らは、GPRC5Dと各種G蛋白質の共発現系のシリーズを構築し、それを用いてGPRC5Dのアゴニスト又はアンタゴニストを探索することにより、生活習慣病又は拒食症に対して治療活性を有する化合物をスクリーニングする方法を開発して、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、視床下部で発現するGPCR、GPRC5Dの発現もしくは機能を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬を提供する。GPRC5Dの発現を特異的に抑制し得る物質としては、好ましくはGPRC5DをコードするmRNAのアンチセンス核酸が挙げられる。この場合、アンチセンス核酸はそれ自体としてだけでなく、該核酸をコードする発現ベクターや、該発現ベクターを導入された宿主細胞の形態でも提供され得る。一方、GPRC5Dの機能を特異的に抑制し得る物質としては、当該受容体のアンタゴニストが挙げられる。

【0010】

本発明はまた、GPRC5Dの発現もしくは機能を増強する物質を有効成分と

する生活習慣病治療薬を提供する。GPCR5Dの機能を特異的に増強し得る物質としては、当該受容体の生理的リガンドやアゴニストが挙げられる。

【0011】

従って、別の本発明は、GPCR5Dのアンタゴニスト又はアゴニストをスクリーニングすることによる、拒食症又は生活習慣病に対して治療活性を有する物質のスクリーニング方法を提供する。当該方法は、GPCR5D又はその均等物を含む脂質二重層膜と、あるファミリーに属するG蛋白質 α サブユニット（以下、 $G\alpha$ ともいう）の受容体結合領域及び任意のG蛋白質 α サブユニットのグアニンヌクレオチド結合領域を少なくとも含むポリペプチドとを、必須の構成要素として少なくとも包含する系を1構成単位とし、該構成単位を $G\alpha$ の各ファミリーの受容体結合領域について構築して得られる、一連の受容体-G蛋白質共発現系において、G蛋白質のGDP・GTP交換反応又は該G蛋白質が作用する効果器の活性を、被験物質の存在下及び非存在下で比較することを特徴とする。

【0012】

従って、本発明はまた、上記のような一連の受容体-G蛋白質共発現系からなる、拒食症又は生活習慣病に対して治療活性を有する物質のスクリーニング系を提供する。

【0013】

本発明はさらに、上記スクリーニング系及びスクリーニング方法により得られる、拒食症又は生活習慣病に対して治療活性を有する物質を有効成分とする拒食症治療薬又は生活習慣病治療薬を提供する。

【0014】

本発明のさらなる特徴及び本発明の利点について、以下の「発明の実施の形態」においてより詳細に説明する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明は、視床下部で発現するGPCR、GPCR5Dの発現もしくは機能を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬を提供する。

【0016】

「GPCR5.D」は、代謝型グルタミン酸レセプター様ファミリー（ファミリーC）の第5群に分類される一連のヒトGPCRのアミノ酸配列を用いたESTデータベースのホモロジー検索により新たに見出された、配列番号2記載のアミノ酸配列からなるヒトGPCR蛋白質の1つである（Brauner-Osborneら, *Biochim. Biophys. Acta*, 1518(3): 237-48 (2001); GeneBankに受託番号: AF209923, XM006896, NM018654として登録されている）。しかしながら、その生理機能や生理的リガンド、共役するG蛋白質（ α サブユニット）のサブタイプ等については不明のままである。本発明者らは、この受容体遺伝子が肥満モデルマウス視床下部で発現していることに着目して研究を進めた結果、上述のように、この蛋白質が摂食中枢の刺激に関与する膜受容体であることを見出した。

【0017】

ヒトGPCR5.Dに対応するGPCRホモログが他の哺乳動物にも存在することが知られている。[例えば、マウスから、ヒトGPCR5.Dとアミノ酸レベルで約82%の同一性を有するホモログmGprc5d（配列番号4）が見出されている（Brauner-Osborneら, 上述; GeneBankに受託番号: AF218809として登録されている）以下、単に「GPCR5.D」と記載される場合は、ヒトGPCR5.Dとそのマウスホモログとを包括的にいうものと理解されたい]。従って、本発明の拒食症治療薬は、ヒトのみならず他の哺乳動物における摂餌障害の治療への使用をも意図している。現代の社会環境は家畜やペット等の動物にとっても高ストレス環境であるといえ、したがって、本発明は獣医学の分野への適用においても有用である。

【0018】

本発明の拒食症治療薬は、GPCR5.Dの発現もしくは機能を抑制する物質を有効成分として含有する。ここで「発現」とは、受容体蛋白質が産生され且つ機能的な状態で細胞膜上に配置されることをいう。従って、「発現を抑制する物質」は、遺伝子の転写レベル、転写後調節のレベル、蛋白質への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル、膜への輸送レベル及び蛋白質フォールディングのレベル等の、いかなる段階で作用するものであってもよい。一方、「機能を抑制する物質」とは、いったん機能的な状態で細胞膜上に配置された受容体に作用して、その活性

型と不活性型との平衡状態を、少なくともより活性側にシフトさせない物質をいう。

【0019】

GPRC5Dの発現を抑制する物質としては、転写抑制因子、RNAポリメラーゼ阻害剤、RNA分解酵素、蛋白質合成阻害剤、蛋白質分解酵素、蛋白質変性剤等が例示されるが、細胞内で発現する他の遺伝子・蛋白質に及ぼす悪影響を最小限にするためには、標的分子に特異的に作用し得る物質であることが重要である。従って、GPRC5Dの発現を抑制する物質の好ましい一態様は、GPRC5DのmRNA（配列番号1（ORFのみを示している）又は3記載の塩基配列からなる）もしくは初期転写産物のアンチセンス核酸である。「アンチセンス核酸」とは、標的mRNA（初期転写産物）を発現する細胞の生理的条件下で該標的mRNA（初期転写産物）とハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つハイブリダイズした状態で該標的mRNA（初期転写産物）にコードされるポリペプチドの翻訳を阻害し得る核酸をいう。アンチセンス核酸の種類はDNAであってもRNAであってもよいし、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。また、天然型のアンチセンス核酸は、細胞中に存在する核酸分解酵素によってそのリン酸ジエステル結合が容易に分解されるので、本発明のアンチセンス核酸は、分解酵素に安定なチオリン酸型（リン酸結合のP=OをP=Sに置換）や2'-O-メチル型等の修飾ヌクレオチドを用いて合成することもできる。アンチセンス核酸の設計に重要な他の要素として、水溶性及び細胞膜透過性を高めること等が挙げられるが、これらはリボソームやマイクロソフェアを使用するなどの剤形の工夫によっても克服することができる。

【0020】

本発明のアンチセンス核酸の長さは、GPRC5DのmRNAもしくは初期転写産物と特異的にハイブリダイズし得る限り特に制限はなく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNA（初期転写産物）の全配列に相補的な配列を含むような配列であってもよい。合成の容易さや抗原性の問題等から、好ましくは約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが例示される。アンチセンス核酸が約25merのオリゴDNAの場合、生理条件下でGPRC5DのmRNAと

ハイブリダイズし得る塩基配列は、標的配列の塩基組成によっても異なるが、通常、約 80%以上の同一性を有するものであればよい。

【0021】

本発明のアンチセンス核酸の標的配列は、アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、GPRC5D蛋白質もしくはその機能的断片の翻訳が阻害される配列であれば特に制限はなく、GPRC5DのmRNAの全配列であっても部分配列であってもよいし、あるいは初期転写産物のイントロン部分であってもよいが、アンチセンス核酸としてオリゴヌクレオチドを使用する場合は、標的配列はGPRC5DのmRNAの5'末端からコード領域のC末端まで（配列番号1記載の塩基配列中塩基番号1～1035、又は配列番号3記載の塩基配列中塩基番号1～1047で示される塩基配列）に位置することが望ましい。好ましくは5'末端からコード領域のN末端側の領域であり、最も好ましくは開始コドン（配列番号3記載の塩基配列においては塩基番号148～150）近傍の塩基配列である。また、標的配列は、それに相補的なアンチセンス核酸がヘアピン構造等の二次構造を形成しないようなものを選択することが好ましい。

【0022】

さらに、本発明のアンチセンス核酸は、GPRC5DのmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズして翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるGPRC5D遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、mRNAへの転写を阻害し得るものであってもよい。

【0023】

GPRC5Dの発現を抑制する物質の別の好ましい一態様は、GPRC5DのmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域（配列番号1記載の塩基配列中塩基番号1～1035、又は配列番号3記載の塩基配列中塩基番号148～1047で示される塩基配列）の内部（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得るリボザイムである。「リボザイム」とは核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列を有するオリゴDNAも同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているので、本発明では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として

用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイリソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。GPRC5DのmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

【0024】

GPRC5Dの発現を抑制する物質のさらに別の形態は、GPRC5DのmRNAもしくは初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な二本鎖オリゴRNAである。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、最近、この現象が動物細胞でも起こることが確認されたことから [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として注目されている。

【0025】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、GPRC5DのcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成する

ことにより調製することができる。RNA i 活性を有する二本鎖オリゴRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

【0026】

GPRC5Dの機能的な発現を翻訳後レベルで抑制する物質の好ましい一態様は、GPRC5Dに対する抗体もしくはそのフラグメントである。該抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよく、周知の免疫学的手法により作製することができる。抗GPRC5D抗体のフラグメントは、GPRC5Dに対する抗原結合部位(CDR)を有する限りいかなるものであってもよく、例えば、Fab、F(ab')₂、ScFv、minibody等が挙げられる。

【0027】

例えば、ポリクローナル抗体は、GPRC5D蛋白質あるいはそのフラグメント(必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)等のキャリア蛋白質に架橋した複合体とすることもできる)を抗原として、市販のアジュバント(例えば、完全または不完全フロイントアジュバント)とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4回程度投与し(部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、その上昇を確認しておく)、最終免疫から約3～約10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。

【0028】

また、モノクローナル抗体は、細胞融合法(例えば、渡邊武、細胞融合法の原理とモノクローナル抗体の作成、谷内昭、高橋利忠編、「モノクローナル抗体とがん—基礎と臨床—」、第2-14頁、サイエンスフォーラム出版、1985年)により作成することができる。例えば、マウスに該因子を市販のアジュバントと共に2

～4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の約3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞（例えば、NS-1, P3X63Ag8など）を細胞融合して該因子に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG法 [*J. Immunol. Methods*, 81(2): 223-228 (1985)] でも電圧パルス法 [*Hybridoma*, 7(6): 627-633 (1988)] であってもよい。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のEIAまたはRIA法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、好ましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得することができる。

【 0 0 2 9 】

しかしながら、ヒトにおける治療効果と安全性を考慮すると、本発明の抗GPRC5D抗体は、ヒトと他の動物（例えば、マウス等）のキメラ抗体であることが好ましく、ヒト化抗体であることがさらに好ましい。ここで「キメラ抗体」とは免疫動物由来の可変部（V領域）とヒト由来の定常部（C領域）を有する抗体をいい、「ヒト化抗体」とはCDRを除いて他の領域をすべてヒト抗体に置き換えた抗体をいう。キメラ抗体やヒト化抗体は、例えば、上記と同様の方法により作製したマウスモノクローナル抗体の遺伝子からV領域もしくはCDRをコードする配列を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体のC領域をコードするDNAと融合したキメラ遺伝子を適当な発現ベクター中にクローニングし、これを適当な宿主細胞に導入して該キメラ遺伝子を発現させることにより取得することができる。

【 0 0 3 0 】

GPRC5Dの機能的な発現を翻訳後レベルで抑制する物質の別の好ましい態様は、GPRC5Dに特異的に結合してその機能的発現を阻害するオリゴヌクレオチド、即ちアプタマーである。GPRC5Dに対するアプタマーは、例えば、以下の手順により取得することができる。即ち、まず、DNA/RNA自動合成機を用いてランダムにオリゴヌクレオチド（例えば、約60塩基）を合成し、オリゴヌクレオチドのプールを作製する。次に、目的の蛋白質、即ちGPRC5D

と結合するオリゴヌクレオチドをアフィニティーカラムで分離する。分離したオリゴヌクレオチドをPCRで増幅し、前述の選抜プロセスで再度選抜する。この過程を約5回以上繰り返すことによって、GPCR5Dに親和性の強いアプタマーを選抜することができる。

【0031】

GPCR5Dの発現を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬は、標的組織（即ち、視床下部）の細胞内に取り込まれて初めてその治療活性を発揮し得るが、有効成分である核酸や蛋白質分子は細胞内に吸収されにくく、しかも体内で速やかに分解されやすい。また、通常これらの分子の取り込みはエンドサイトーシスにより行われるので、リソソーム酵素による分解を受けやすい。従って、GPCR5Dの発現を抑制する物質を、視床下部の細胞に安定な状態で送達し、細胞膜の透過性を向上させ、リソソーム／エンドソームからの薬剤の遊離を促進するようなドラッグデリバリーシステム（DDS）の設計が重要である。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド等のオリゴ核酸分子の場合、上述のようにリン酸結合や糖部分（2' 位、3' 位等）を修飾した核酸の他、リン酸と糖部分をペプチド結合に置き換えたPNA、リン酸骨格の代わりにモルフィン骨格を有するオリゴヌクレオチド等、化学修飾により、ヌクレアーゼに対する安定性、細胞内移行、リソソーム／エンドソームからの遊離を改善させることが可能であり、これらの修飾オリゴ核酸はDNA／RNA自動合成機を用いて容易に調製することができる。

【0032】

一方、ポリ-L-リジン、アビジン、コレステロール又はリン脂質成分等の付属基をオリゴヌクレオチドや抗体分子に結合させることによって、細胞膜透過性を向上させることもできる。

【0033】

さらに、オリゴヌクレオチドや抗体分子をカチオン性リポソームに被包して製剤化することもできる。リポソーム中に被包することにより、有効成分はヌクレアーゼやプロテアーゼによる分解から保護され、且つリポソーム膜のカチオン性表面は細胞表面の陰性荷電分子と結合してエンドサイトーシスにより細胞内に取り

り込まれる。カチオン性リポソームは、例えば、DOTMA、DDAB、DMRIE等のカチオン性脂質と、膜融合能を持つ中性脂質DOPEを混合して調製することができる。核酸や蛋白質はポリアニオン性であるので、カチオン性リポソームと混合することにより容易に複合体を形成する。また、リポソーム膜に視床下部の細胞で特異的に発現する細胞表面分子に対する抗体もしくはリガンドを組み込むことにより、細胞特異的なターゲティングを行うこともできる。例えば抗GPRC5D抗体自体をリポソーム膜に組み込むこともできる。

【0034】

また、エンドサイトーシスにより取り込まれたリポソームをリソソーム酵素による分解から保護するために、pH感受性リポソーム（酸性pHで膜が不安定化し、リソソームと融合する前にエンドソーム小胞から細胞質に内容物が遊離される）や、紫外線照射等によりウイルスRNAを完全に断片化したセンダイウイルスとの融合リポソーム（センダイウイルスの膜融合能を用いてエンドサイトーシス経路を回避する）を使用することも好ましい。

【0035】

上記のような剤形に設計された本発明の拒食症治療薬は、適当な無菌のビヒクルに溶解もしくは懸濁して、経口的又は非経口的に投与され得る。非経口的投与経路としては、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、気道内等の全身投与、あるいは視床下部付近への局所投与が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、側脳室内への局所投与が挙げられる。

【0036】

本発明の拒食症治療薬の投与量は、有効成分の種類、分子の大きさ、投与経路、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.0008～約2.5mg/kg、好ましくは約0.008～約0.025mg/kgの範囲であり、これを1回もしくは数回に分けて投与することができる。

【0037】

GPRC5Dの発現を抑制する物質が、アンチセンス核酸、リボザイム又はアプタマーのような核酸分子（以下、有効核酸分子ともいう）である場合、本発明

の拒食症治療薬は、該有効核酸分子をコードする発現ベクターを有効成分とすることもできる。当該発現ベクターは、上記の有効核酸分子をコードするオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドが、投与対象である哺乳動物の視床下部細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されているか、あるいは投与された動物の視床下部細胞内で、一定の条件下に機能的に連結された形態に変化し得るような位置に配置されていなければならない。使用されるプロモーターは、投与対象である哺乳動物の視床下部細胞内で機能し得るものであれば特に制限はないが、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR、ラウス肉腫ウイルスLTR、MoMuLV由来LTR、アデノウイルス由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びにβ-アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーターなどが挙げられる。「一定の条件下に機能的に連結された形態に変化し得るような位置に配置される」とは、例えば、以下でさらに詳述するように、プロモーターと有効核酸分子をコードするオリゴ（ポリ）ヌクレオチドが、該プロモーターからの有効核酸分子の発現を妨げるのに十分な長さを有するスペーサー配列により隔てられた、同方向に配置される2つのリコンビナーゼ認識配列によって分断された構造を有し、該認識配列を特異的に認識するリコンビナーゼの存在下に該スペーサー配列が切り出されて、有効核酸分子をコードするポリヌクレオチドがプロモーターに機能的に連結されるように配置されることをいう。

【0038】

本発明の発現ベクターは、好ましくは有効核酸分子をコードするオリゴ（ポリ）ヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子（テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等）をさらに含有することもできる。発現ベクターが上述のようにリコンビナーゼ認識配列に挟まれたスペーサー配列を有する場合、該選択マーカー遺伝子は当該スペーサー配列内に配置することもできる。

【0039】

本発明の発現ベクターに使用されるベクターは特に制限されないが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。アデノウイルスは、遺伝子導入効率が極めて高く、非分裂細胞にも導入可能である等の利点を有する。但し、導入遺伝子の宿主染色体への組み込みは極めて稀であるので、遺伝子発現は一過性で通常約4週間程度しか持続しない。治療効果の持続性を考慮すれば、比較的遺伝子導入効率が高く、非分裂細胞にも導入可能で、且つ逆位末端繰り返し配列（ITR）を介して染色体に組み込まれ得るアデノ随伴ウイルスの使用もまた好ましい。

【0040】

アンチセンス核酸やリボザイム等の有効核酸分子は本来異物であり、これらの構成的且つ過剰な発現は、当該遺伝子を導入された宿主動物にとって毒性が強く、副作用を引き起こす場合も考えられる。従って、本発明の好ましい態様においては、発現ベクターは、不要な時期及び／又は不要な部位での有効核酸分子の過剰発現による悪影響を防ぐために、有効核酸分子を時期特異的及び／又は視床下部細胞特異的に発現させることができる。このようなベクターの第一の実施態様としては、投与対象となる動物の視床下部細胞において特異的に発現する遺伝子由来のプロモーターに機能的に連結した有効核酸分子をコードするオリゴ（ポリ）ヌクレオチドを含むベクターが挙げられる。例えば、GPRC5D遺伝子のネイティヴなプロモーター等が挙げられる。

【0041】

本発明の時期特異的且つ視床下部特異的発現ベクターの第二の実施態様として、外因性の物質によってトランスに発現が制御される誘導プロモーターに機能的に連結した有効核酸分子をコードするオリゴ（ポリ）ヌクレオチドを含むベクターが挙げられる。誘導プロモーターとして、例えば、メタロチオネイン-1 遺伝子プロモーターを用いた場合、金、亜鉛、カドミウム等の重金属、デキサメサゾン等のステロイド、アルキル化剤、キレート剤またはサイトカインなどの誘導物

質を、所望の時期に視床下部に局所投与することにより、任意の時期に視床下部特異的に有効核酸分子の発現を誘導することができる。

【 0 0 4 2 】

本発明の時期特異的且つ視床下部特異的発現ベクターの別の好ましい態様は、プロモーターと有効核酸分子をコードするオリゴ（ポリ）ヌクレオチドとが、該プロモーターからの有効核酸分子の発現を妨げるのに十分な長さを有するスペーサー配列により隔てられた、同方向に配置される２つのリコンビナーゼ認識配列によって分断された構造を有するベクターである。該ベクターが視床下部の細胞内に導入されただけではプロモーターは有効核酸分子の転写を指示することができない。しかしながら、所望の時期に視床下部に該認識配列を特異的に認識するリコンビナーゼを局所投与するか、あるいは該リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを局所投与して該リコンビナーゼを視床下部の細胞内で発現させると、該認識配列間で該リコンビナーゼを介した相同組換えが起こり、その結果、該スペーサー配列が切り出され、有効核酸分子をコードするオリゴ（ポリ）ヌクレオチドがプロモーターに機能的に連結されて、所望の時期に視床下部特異的に有効核酸分子が発現される。

【 0 0 4 3 】

上記ベクターに使用されるリコンビナーゼ認識配列は、投与対象に内在のリコンビナーゼによる組換えを防ぐために、内在のリコンビナーゼによっては認識されない異種リコンビナーゼ認識配列であることが望ましい。したがって、該ベクターにトランスに作用するリコンビナーゼもまた異種リコンビナーゼであることが望ましい。このような異種リコンビナーゼと該リコンビナーゼ認識配列の組み合わせとしては、大腸菌のバクテリオファージ P 1 由来の Cre リコンビナーゼと lox P 配列、あるいは酵母由来の Flp リコンビナーゼと frt 配列が好ましく例示されるが、それらに限定されるものではない。

【 0 0 4 4 】

Cre リコンビナーゼはバクテリオファージで発見されたが、特異的な DNA 組換え反応は、原核細胞だけでなく真核細胞である動物細胞や動物ウイルスでも機能することが知られている。同一 DNA 分子上に同方向の 2 つの loxP 配列が存在

する場合は、Creリコンビナーゼはその間に挟まれたDNA配列を切り出して環状分子を形成させる（切り出し反応）。一方、異なるDNA分子上に2つのloxP配列が存在し、その一方が環状DNAである場合は、loxP配列を介して環状DNAが他方のDNA分子上に挿入される（挿入反応）[J. Mol. Biol., 150: 467-486 (1981); J. Biol. Chem., 259: 1509-1514 (1984); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1026-1029 (1984)]。切り出し反応の例は、動物培養細胞 [Nucleic Acids Res., 17: 147-161 (1989); Gene, 181: 207-212 (1996)]、動物ウイルス [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5166-5170 (1988); J. Virol., 69: 460-4606 (1995); Nucleic Acids Res., 23: 3816-3821 (1995)]、トランスジェニックマウス [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6232-6236 (1992); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6861-6865 (1992); Cell, 73: 1155-1164 (1993); Science, 265: 103-106 (1994)] 等で報告されている。

【 0 0 4 5 】

リコンビナーゼ／リコンビナーゼ認識配列の相互作用を利用した本発明の時期特異的且つ視床下部特異的発現ベクターのプロモーターとしては、所望の時期及び部位での発現を確実にするために、好ましくはウイルス由来プロモーターや哺乳動物の構成蛋白質遺伝子のプロモーターが使用される。

【 0 0 4 6 】

有効核酸分子をコードする発現ベクターを有効成分とする本発明の拒食症治療薬の投与は、治療対象動物自身の神経細胞を体外に取り出し、培養してから導入を行って体内に戻す ex vivo 法と、投与対象の体内に直接ベクターを投与して導入を行う in vivo 法のいずれかで行われる。ex vivo 法の場合、標的細胞へのベクターの導入は、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム共沈殿法、PEG法、エレクトロポレーション法等により行うことができる。in vivo 法の場合、ウイルスベクターは、注射剤等の形態で静脈内、動脈内、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内等に投与される。あるいは、静脈内注射などによりベクターを投与すると、ウイルスベクターに対する中和抗体の産生が問題となるが、標的細胞の存在する視床下部付近、例えば側脳室内に局所的にベクターを注入すれば (in situ 法)、抗体の存在による悪影響を軽減することができる。

【0047】

また、有効核酸分子をコードする発現ベクターとして非ウイルスベクターを使用する場合、該発現ベクターの導入は、有効核酸分子自体を有効成分とする治療薬の剤形について上記したように、ポリ-L-リジン-核酸複合体などの高分子キャリアーを用いるか、リボソームに被包して行うことができる。あるいは、パーティクルガン法を用いてベクターを標的細胞に直接導入することもできる。

【0048】

リコンビナーゼ／リコンビナーゼ認識配列の相互作用を利用したベクターの使用において、トランスに作用する物質としてリコンビナーゼ自体を局所投与する場合、例えば、リコンビナーゼを適当な無菌のビヒクル（例えば、人工の脳髄液等）に溶解または懸濁して視床下部に注入すればよい。一方、トランスに作用する物質としてリコンビナーゼ発現ベクターを視床下部に局所投与する場合、該リコンビナーゼ発現ベクターは、リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドが、投与対象の視床下部細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結した発現カセットを有するものであれば特に制限されない。使用されるプロモーターが構成プロモーターである場合、不要な時期におけるリコンビナーゼの発現を防ぐために、視床下部に投与されるベクターは、例えばアデノウイルスのように、宿主細胞の染色体への組込みが稀なものであることが望ましい。しかしながら、アデノウイルスベクターを使用した場合、リコンビナーゼの一過発現はせいぜい4週間程度しか持続しないので、治療が長期に及ぶ場合には第二、第三の投与が必要になる。リコンビナーゼを所望の時期に発現させる別のアプローチとして、メタロチオネイン遺伝子プロモーターのような誘導プロモーターの使用が挙げられる。この場合、レトロウイルス等のインテグレーション効率の高いウイルスベクターの使用が可能となる。

【0049】

GPRC5Dの発現を抑制する物質が、アンチセンス核酸、リボザイム又はアプタマーのような核酸分子である場合、本発明の拒食症治療薬は、上記のような有効核酸分子をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を有効成分とすることもできる。使用される宿主細胞としては、上記のような発現ベクターのex vivo導

入法において、投与対象から標的細胞として取り出される自己細胞、または同種異系（例えば、ヒトの場合、死産の胎児や脳死患者等）もしくは異種（ヒトの場合、ブタやサル等の他の哺乳動物）の個体から取り出した神経細胞、あるいはそれらの神経幹細胞やES細胞を培養・分化させて得られる神経細胞などが例示される。中枢神経系は拒絶反応の最も起こりにくい器官・組織であるので、少量の免疫抑制剤の併用により異種細胞であっても生着させることが可能である。

【0050】

また、別の態様においては、投与対象となる動物の鼻腔、咽頭、口腔、腸管等に常在する細菌等を宿主細胞として、常法によりこれを有効核酸分子をコードする発現ベクターで形質転換し、得られる形質転換体を宿主細胞が通常存在する投与対象内の部位に送達することもできる。最近、薬物を脳に移行させる際、血液脳関門以外の経路として鼻から脳脊髄液に直接移行させる経路が検討されており、鼻腔常在菌の使用はこの目的に適うものである。

【0051】

有効核酸分子をコードする発現ベクター又は該発現ベクターを担持する宿主細胞を有効成分とする本発明の拒食症治療薬の投与量は、有効成分の種類、分子の大きさ、プロモーター活性、投与経路、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、有効核酸分子自体を有効成分とする治療薬を投与する場合の適切な投与量に相当する量の有効核酸分子を、ベクターもしくは宿主細胞を投与された動物の体内で発現させる程度であることが好ましく、例えば、成人1日あたりベクター量として約2～約20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、好ましくは約5～約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である。

【0052】

GPRC5Dは、摂食量を負に調節するシグナル伝達を仲介する膜受容体蛋白質であることから、この受容体の発現を増強することにより、摂食行動を抑制することができる。従って、本発明はまた、GPRC5Dの発現を増強する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬を提供する。一般に、「生活習慣病」は、食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣がその発症・進行に関与する疾患群として規定されるが、本発明においては、特に「摂食量を抑制方向に調節する

ことにより治療効果がもたらされ得る疾患群」をいい、例えば、糖尿病、肥満症、高脂血症、高尿酸血症等が代表的なものとして含まれる。患者はこれらの疾患の2つ以上を併発している場合が多い。

【0053】

GPRC5Dの発現を増強する物質としては、例えば、GPRC5D遺伝子からのRNA転写を促進し得るトランス活性化因子、スプライシングやmRNAの細胞質移行を促進し得る因子、mRNAの分解を抑制する因子、リボソームのmRNAへの結合を促進し得る因子、GPRC5D蛋白質の分解を抑制する因子、GPRC5D蛋白質の膜への輸送を促進する因子等が挙げられるが、より直接的且つ特異的な物質として、GPRC5D蛋白質もしくはその均等物、GPRC5Dをコードする核酸を含む発現ベクター又は該発現ベクターを担持する宿主細胞が好ましく例示される。

【0054】

ここで「GPRC5D蛋白質」は、配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなる蛋白質であり、「その均等物」とは、配列番号2又は4記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加または修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と同等のリガンド受容体相互作用を示し、且つG α と共役して該サブユニットのGDP・GTP交換反応を促進する活性を有するポリペプチド、あるいはこの定義の範囲外ではあるが、ヒト及びマウスのGPRC5D遺伝子と分子進化論上同一の起源を有する遺伝子によりコードされる他の哺乳動物由来の蛋白質、即ちオルソログ(ortholog)をいう。したがって、本発明の生活習慣病治療薬は、ヒト及びマウスのみならず、他の哺乳動物における糖尿病、肥満症、高脂血症、高尿酸血症等の治療への使用をも意図している。近年のペットブームにより、過剰な給餌と運動不足の結果、肥満症等の生活習慣病様の疾患を発症する動物が増加していることから、本発明の治療薬は獣医学の分野においても極めて有用である。

【0055】

GPRC5D蛋白質又はその均等物は、例えばヒト又はマウス、あるいはウシ、ブタ、サル、ラット等の他の哺乳動物の視床下部組織由来の膜含有画分から、

抗GPRC5D抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより単離することができる。あるいは、当該組織由来のcDNAライブラリーもしくはゲノミックライブラリーから、GPRC5DのcDNAクローンをプローブとして単離されるDNAクローンを適当な発現ベクター中にクローニングし、宿主細胞に導入して発現させ、細胞培養物の膜含有画分から抗GPRC5D抗体や、His-tag、GST-tag等を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる。また、当該均等物は、GPRC5DのcDNA配列（配列番号1記載の塩基配列中塩基番号1～1035、又は配列番号3記載の塩基配列中塩基番号148～1047で示される塩基配列）を基に、部位特異的変異誘発等的人為的処理により一部に変異を導入したものであってもよい。保存的アミノ酸置換は周知であり、当業者はGPRC5Dの受容体特性を変化させない範囲で、GPRC5D蛋白質に適宜変異を導入することができる。しかしながら、リガンド結合ドメイン、好ましくはさらにインバースアゴニストが結合し得る細胞外ループ及びN末端鎖は高度に保存されている必要があるので、このような領域には変異を導入しないことが望ましい。

【0056】

GPRC5D蛋白質又はその均等物を有効成分とする生活習慣病治療薬は、抗GPRC5D抗体を有効成分とする拒食症治療薬に関して上記したように、ポリ-L-リジン、アビジン、コレステロール又はリン脂質成分等の付属基を結合させることによって、細胞膜透過性を向上させることができる。あるいは、本治療薬は、GPRC5D蛋白質又はその均等物をカチオン性リポソームに被包して製剤化することもできる。蛋白質はポリアニオン性であるので、カチオン性リポソームと混合することにより容易に複合体を形成する。また、リポソーム膜に視床下部の細胞で特異的に発現する細胞表面分子に対する抗体もしくはリガンドを組み込むことにより、細胞特異的なターゲティングを行うこともできる。例えば、抗GPRC5D抗体（好ましくは、アンタゴニスト活性又はインバースアゴニスト活性を有しない抗体）をリポソーム膜に組み込むこともできる。

【0057】

GPRC5D蛋白質又はその均等物を有効成分とする生活習慣病治療薬は、適

当な無菌のビヒクルに溶解もしくは懸濁して、経口的又は非経口的に投与され得る。非経口的投与経路としては、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、気道内等の全身投与、あるいは視床下部付近への局所投与が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、側脳室内への局所投与が挙げられる。

【0058】

本生活習慣病治療薬の投与量は、投与経路、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.0008～約2.5mg/kg、好ましくは約0.008～約0.025mg/kgの範囲であり、これを1回もしくは数回に分けて投与することができる。

【0059】

GPRC5Dの発現を増強する物質が、GPRC5D蛋白質又はその均等物である場合、本発明の生活習慣病治療薬は、それらのポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターであってもよいし、また、該発現ベクターを担持する宿主細胞であってもよい。ここで使用される発現ベクターや宿主細胞は、上記の拒食症治療薬の場合と同様のものであってよい。さらに、これらの生活習慣病治療薬の投与経路及び投与量についても、上記の拒食症治療薬のそれぞれに関して例示したものを、同様に好ましく使用することができる。

【0060】

本発明はまた、視床下部細胞の細胞膜上に発現したGPRC5Dの機能を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬、あるいは該機能を促進する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬を提供する。これらの治療薬は、GPRC5Dに対してアゴニスト活性、アンタゴニスト活性又はインバースアゴニスト活性を有する物質をスクリーニングすることによって得ることができる。従って、本発明はまた、GPRC5Dの機能を抑制もしくは促進する物質のスクリーニング方法と、そのためのスクリーニング系を同時に提供する。

【0061】

ここで「アゴニスト活性」とは、GPRC5D受容体に特異的に結合し、GPRC5Dの活性型と不活性型の平衡状態をより活性側にシフトさせる性質をいう

。従って、アゴニスト活性を有する物質には、いわゆるフルアゴニストや部分アゴニストの他、GPRC5Dの生理的リガンドも包含される。「アンタゴニスト活性」とは、GPRC5Dのリガンド結合部位に拮抗的に結合するが、活性型と不活性型の平衡状態にほとんど又は全く影響を及ぼさない性質をいう。従って、アンタゴニスト活性を有する物質とは、いわゆるニュートラルアンタゴニストをいい、インバースアゴニストは含まないものとする。「インバースアゴニスト活性」とは、GPRC5Dの任意の部位に結合して、GPRC5Dの活性型と不活性型の平衡状態をより不活性側にシフトさせる性質をいう。尚、本明細書において、以下、単に「リガンド」という場合は、生理的リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト及びインバースアゴニストをすべて包含するものとする。

【0062】

本発明のスクリーニング系は、GPRC5D蛋白質又はその均等物を含む脂質二重層膜、並びにあるファミリーに属する $G\alpha$ の受容体結合領域及び任意の $G\alpha$ のグアニンヌクレオチド結合領域を少なくとも含むポリペプチドを、必須の構成要素として含む系を1構成単位とし、該構成単位を $G\alpha$ の各ファミリー（即ち、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ ）の受容体結合領域について構築して得られる、一連の受容体-G蛋白質共発現系である。GPRC5D蛋白質又はその均等物は、上記の生活習慣病治療薬の有効成分として上記した通りのものである。GPRC5D蛋白質又はその均等物を保持する脂質二重層膜の由来は、該受容体蛋白質が該膜上で本来の立体構造をとることができる限り特に制限されないが、好ましくはヒト、ウシ、ブタ、サル、マウス、ラット等の哺乳動物細胞の細胞膜を含有する画分、例えば、無傷細胞、細胞ホモジネート、あるいは該ホモジネートから遠心分離等により分画される細胞膜画分が挙げられる。しかしながら、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、コレステロール等の各種脂質を適当な比率、好ましくは哺乳動物細胞の細胞膜におけるそれに近い比率で混合した溶液から常法により調製される人工脂質二重膜もまた、本発明の一実施態様において好ましく使用され得る。

【0063】

G_s ファミリーに属する $G\alpha$ （ $G\alpha_s$ ）は、アデニル酸シクラーゼを効果器とし

、その活性を促進するものであり、例えば、 $G\alpha_{s-1} \sim G\alpha_{s-4}$ 、あるいは G_{olf} 等が挙げられる。 G_i ファミリーに属する $G\alpha$ ($G\alpha_i$) は、アデニル酸シクラーゼを効果器とし、その活性を抑制するものであり、例えば、 $G\alpha_{i-1} \sim G\alpha_{i-3}$ 、あるいは G_{12} 等が挙げられる。 G_q ファミリーに属する $G\alpha$ ($G\alpha_q$) は、ホスホリパーゼCを効果器とし、その活性を促進するものであり、例えば、 $G\alpha_q$ あるいは G_{16} 等が挙げられる。本スクリーニング系の $G\alpha_s$ ポリペプチド、 $G\alpha_i$ ポリペプチド及び $G\alpha_q$ ポリペプチドはそれぞれ、自身のGPCRとの結合に関与する領域 (RB領域) と任意の $G\alpha$ のグアニンヌクレオチドとの結合に関与する領域 (GB領域) を有することが必要である。 $G\alpha$ のX線結晶構造解析の結果から、GPCR結合領域はC末端近傍にあり、一方、グアニンヌクレオチド結合領域は、*ras*蛋白質のヌクレオチド結合部位と相同な領域 (N末端側から、Pボックス、G'ボックス、Gボックス、G''ボックスと呼ばれるアミノ酸モチーフ、並びに高度にヘリックス化したドメイン内の αE ヘリックスの先頭及び αF ヘリックスなど) であることが明らかになっている。GPCR5Dに対する生理的リガンド又はアゴニストが該受容体に結合すると、該受容体の $G\alpha$ 活性化ドメインと該受容体に共役する $G\alpha$ のRB領域とが相互作用して $G\alpha$ のコンフォメーション変化を生じ、GB領域からGDPが解離して速やかにGTPを結合する。 $G\alpha$ -GTPは効果器に作用してその活性を促進又は抑制する。一方、インバースアゴニストが結合すると、受容体のコンフォメーション変化により $G\alpha$ 活性化ドメインが不活性化されるので、活性化型の $G\alpha$ -GTPレベルが減少し、効果器への作用が阻害される。ここで、GTPの代わりに、例えば、 ^{35}S 標識したGTP γS 等の $G\alpha$ のGTPase活性によって加水分解を受けないGTPアナログを系に添加しておけば、被験物質の存在下と非存在下での膜に結合した放射活性を測定・比較することにより、 $G\alpha$ におけるGDP・GTP交換反応に及ぼす被験物質の効果を評価することができ、GPCR5Dに対するリガンド活性を有する物質をスクリーニングすることができる。即ち、被験物質の存在下で放射活性が増加すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。一方、放射活性が減少すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対

する治療活性を有する。

【0064】

いったんGPRC5Dに対するリガンドがスクリーニングされれば、該受容体と共役する $G\alpha$ のファミリーが明らかになるので、以後のスクリーニングは、当該ファミリーに属する $G\alpha$ ポリペプチドを構成要素として含む系のみを用いて行うことができる。

【0065】

GPRC5Dに対するリガンドの活性は、 $G\alpha$ ポリペプチドの効果器への作用を指標として測定することもできる。この場合、本発明のスクリーニング系は、GPRC5D蛋白質又はその均等物に加えて、さらに効果器を含む脂質二重層膜を構成要素として含む必要がある。また、 $G\alpha$ ポリペプチドは該効果器と相互作用するための領域をさらに含む必要がある。各ファミリーに属する $G\alpha$ は効果器の種類又は作用の方向が異なるので、それぞれが自身の効果器相互作用領域を有するよりも、共通の効果器相互作用領域をすべての $G\alpha$ ポリペプチドが有することがより好ましい。従って、本スクリーニング系において、少なくとも2種の $G\alpha$ ポリペプチドは他のファミリーに属する $G\alpha$ の効果器相互作用領域を含むキメラポリペプチドである。例えば、効果器としてホスホリパーゼCを用いる場合、 $G\alpha_q$ ポリペプチドはネイティブなものであってよいが、 $G\alpha_s$ ポリペプチド及び $G\alpha_i$ ポリペプチドは効果器相互作用領域が $G\alpha_q$ のもので置換されたキメラポリペプチドであることが必要である。別のファミリーに属する $G\alpha$ の効果器相互作用領域を含むキメラポリペプチドの最も簡便な例としては、別のファミリーに属する $G\alpha$ のC末端の約5アミノ酸程度（即ち、RB領域）を、自身のC末端配列で置換したものが挙げられる。

【0066】

本スクリーニング系において、3種の $G\alpha$ ポリペプチドが $G\alpha_s$ 又は $G\alpha_i$ の効果器相互作用領域を含む場合、効果器としてアデニル酸シクラーゼを含む脂質二重層膜が用いられる。一方、 $G\alpha$ ポリペプチドが、 $G\alpha_q$ の効果器相互作用領域を含む場合は、効果器としてホスホリパーゼCを含む脂質二重層膜を用いる必要がある。

【0067】

効果器としてアデニル酸シクラーゼ（以下、ACともいう）を含むスクリーニング系においては、 $G\alpha$ ポリペプチドの効果器への作用は、AC活性を直接測定することにより評価することができる。AC活性の測定には公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば、ACを含む膜画分にATPを添加し、生成するcAMP量を、抗cAMP抗体を用いてRI（例えば、 ^{125}I ）、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ等）、蛍光物質（例えば、FITC、ローダミン等）等で標識したcAMPとの競合イムノアッセイにより測定する方法や、ACを含む膜画分に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを添加し、生成する $[\text{}^{32}\text{P}]$ cAMPをアルミナカラム等で分離後、その放射活性を測定する方法等が挙げられるが、これに限定されない。 $G\alpha$ ポリペプチドが $G\alpha_s$ の効果器相互作用領域を含む場合、被験物質の存在下及び非存在下でAC活性を測定・比較し、被験物質存在下でAC活性が増加すれば該被験物質はGPCR5Dに対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。反対にAC活性が減少すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対する治療活性を有する。一方、 $G\alpha$ ポリペプチドが $G\alpha_i$ の効果器相互作用領域を含む場合は、被験物質存在下でAC活性が増加すれば該被験物質はGPCR5Dに対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対する治療活性を有する。反対にAC活性が減少すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。

【0068】

スクリーニング系として無傷動物細胞を用いる場合は、 $G\alpha$ ポリペプチドのACへの作用は、細胞内のcAMP量を測定するか、あるいは細胞を $[\text{}^3\text{H}]$ アデニンで標識し、生成した $[\text{}^3\text{H}]$ cAMPの放射活性を測定することによっても評価することができる。細胞内cAMP量は、被験物質の存在下及び非存在下で細胞を適当な時間インキュベートした後、細胞を破碎して得られる抽出液について、上記の競合イムノアッセイを実施することにより測定することができるが、公知の他のいかなる方法も使用することができる。

【0069】

別の態様として、cAMP量をcAMP応答エレメント(CRE)の制御下にあるリポーター遺伝子の発現量を測定することにより、評価する方法もある。ここで使用される発現ベクターについては後に詳述するが、概説すると、CREを含むプロモーターの下流にリポーター蛋白質をコードするDNAを連結した発現カセットを含むベクターを導入された動物細胞を、被験物質の存在下及び非存在下で適当な時間培養し、細胞を破碎して得られた抽出液におけるリポーター遺伝子の発現を公知の手法を用いて測定・比較することにより、細胞内cAMP量を評価するというものである。

【0070】

従って、 $G\alpha$ ポリペプチドが $G\alpha_s$ の効果器相互作用領域を含む場合、被験物質の存在下で細胞内cAMP量(もしくはCRE制御下にあるリポーター遺伝子の発現量)が増加すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。反対にcAMP量(もしくはリポーター遺伝子の発現量)が減少すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対する治療活性を有する。一方、 $G\alpha$ ポリペプチドが $G\alpha_i$ の効果器相互作用領域を含む場合、被験物質の存在下で細胞内cAMP量(もしくはCRE制御下にあるリポーター遺伝子の発現量)が増加すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対する治療活性を有する。反対にcAMP量(もしくはリポーター遺伝子の発現量)が減少すれば、該被験物質はGPCR5Dに対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。

【0071】

一方、効果器としてホスホリパーゼC(以下、PLCともいう)を含むスクリーニング系(即ち、 $G\alpha$ ポリペプチドが $G\alpha_q$ の効果器相互作用領域を含む場合)においては、 $G\alpha$ ポリペプチドの効果器への作用は、PLC活性を直接測定することにより評価することができる。PLC活性は、例えば、 3H 標識したホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸をPLC含有膜画分に添加し、生成するイノシトールリン酸量を、公知の手法を用いて測定することにより評価することができる。被験物質の存在下及び非存在下でPLC活性を測定・比較し、被

験物質存在下で PLC 活性が増加すれば、該被験物質は GPCR5D に対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。反対に PLC 活性が減少すれば、該被験物質は GPCR5D に対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対する治療活性を有する。

【0072】

スクリーニング系として無傷動物細胞を用いる場合は、 $G\alpha$ ポリペプチドの PLC への作用は、細胞に [3H] イノシトールを添加し、生成した [3H] イノシトールリン酸の放射活性を測定したり、細胞内の Ca^{2+} 量を測定することによっても評価することができる。細胞内 Ca^{2+} 量は、被験物質の存在下及び非存在下で細胞を適当な時間インキュベートした後、蛍光プローブ (fura-2、indo-1、fluor-3、Calcium-Green I 等) を用いて分光学的に測定するか、カルシウム感受性発光蛋白質であるエクオリン等を用いて測定することができるが、公知の他のいかなる方法を使用してもよい。蛍光プローブを用いた分光学的測定に適した装置として、FLIPR (Molecular Devices 社) システムが挙げられる。

【0073】

別の態様として、 Ca^{2+} によりアップレギュレートされる TPA (12-オ-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート) 応答エレメント (TRE) の制御下にあるリポーター遺伝子の発現量を測定することにより、 Ca^{2+} 量を評価する方法もある。ここで使用される発現ベクターについては後に詳述するが、概説すると、TRE を含むプロモーターの下流にリポーター蛋白質をコードする DNA を連結した発現カセットを含むベクターを導入された動物細胞を、被験物質の存在下及び非存在下で適当な時間培養し、細胞を破碎して得られた抽出液におけるリポーター遺伝子の発現を公知の手法を用いて測定・比較することにより、細胞内 Ca^{2+} 量を評価するというものである。

【0074】

従って、被験物質の存在下で細胞内 Ca^{2+} 量 (もしくは TRE 制御下にあるリポーター遺伝子の発現量) が増加すれば、該被験物質は GPCR5D に対するアゴニスト活性を有し、従って生活習慣病に対する治療活性を有する。反対に細胞内 Ca^{2+} 量 (もしくはリポーター遺伝子の発現量) が減少すれば、該被験物質は

GPRC5Dに対するインバースアゴニスト活性を有し、従って拒食症に対する治療活性を有する。

【0075】

本発明のスクリーニング法に供される被験物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

【0076】

本発明のスクリーニング系の1構成単位である、GPRC5D蛋白質又はその均等物を含む脂質二重層膜及びG α ポリペプチドを必須構成要素として含有する系の好ましい一実施態様は、GPRC5D蛋白質又はその均等物をコードするDNAを含む発現ベクターと、あるファミリーに属するG α のRB領域及び任意のG α のGB領域を少なくとも含むポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターとでトランスフェクトした宿主動物細胞、該細胞のホモジネートまたは該細胞由来の膜画分である。

【0077】

「GPRC5D蛋白質又はその均等物をコードするDNA」は、配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは該アミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加または修飾されたアミノ酸配列からなり、GPRC5Dと同等のリガンドー受容体相互作用を示し、且つG α と共役して該サブユニットのGDP・GTP交換反応を促進する活性を有するポリペプチド、あるいは配列番号2又は4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドのオルソログをコードするDNAであれば特に制限はない。GPRC5D cDNAのコード領域（配列番号1記載の塩基配列中塩基番号1～1035、又は配列番号3記載の塩基配列中塩基番号148～1047で示される塩基配列）の他、ウシ、ブタ、サル、ラット等のヒト又はマウス以外の哺乳動物由来のGPRC5Dに対応するGPCRをコードするDNA等が例示され、これらは、哺乳動物の視床下部を含む脳神経組織由来のcDNAライブラリーもしくはゲノ

ミックライブラリーから、GPRC5DのcDNAをプローブとして単離され得る。また、当該均等物は、GPRC5DのcDNAを基に、部位特異的変異誘発等の人為的処理により一部に変異を導入したものであってもよい。

【0078】

3種のG α ポリペプチドをコードするDNAは、少なくとも各ファミリーのG α のRB領域をコードする配列と、任意のG α のGB領域をコードする配列とを有することが必要である。各種G α 遺伝子の配列は公知であり、また、上述の通り、G α のX線結晶構造解析の結果から、RB領域及びGB領域はよく知られている。従って、当業者は、所望によりG α のコード配列の一部を欠失したフラグメントを容易に構築することができる。

【0079】

G α ポリペプチドの効果器への作用を指標とするスクリーニング系においては、G α ポリペプチドをコードするDNAは、効果器相互作用領域をコードする核酸配列をさらに含む必要がある。上述のように、3種のG α ポリペプチドは共通の効果器相互作用領域を有するので、少なくとも2種のG α ポリペプチドは別のファミリーの効果器相互作用領域を有するキメラである。当該キメラポリペプチドをコードするDNAの最も簡便な例としては、目的の効果器相互作用領域を有するG α のcDNAのC末端の約5アミノ酸をコードする配列を、PCR等の公知の手法を用いて、他のファミリーのG α のC末端配列をコードするDNA配列に置換したものが挙げられる。

【0080】

GPRC5D蛋白質又はその均等物をコードするDNA、及びG α ポリペプチドをコードするDNAは、宿主哺乳動物細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されていなければならない。使用されるプロモーターは、哺乳動物細胞内で機能し得るものであれば特に制限はないが、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR、ラウス肉腫ウイルスLTR、MoMuLV由来LTR、アデノウイルス由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びに β -アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成蛋白質

遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。使用される発現ベクターは、上記プロモーターに加えて、その下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有することが好ましく、プロモーター領域とターミネーター領域の間にコーディングDNAを挿入し得るように、適当な制限酵素認識部位、好ましくは該ベクターを1箇所のみで切断するユニークな制限酵素認識部位を有することが望ましい。さらに、該発現ベクターは、選択マーカー遺伝子（テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤抵抗性遺伝子、栄養要求性変異相補遺伝子等）をさらに含有していてもよい。

【0081】

本発明のスクリーニング系に使用されるベクターとしては、ヒト等の哺乳動物での使用に好適なレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。

【0082】

GPRC5D蛋白質又はその均等物をコードするDNAと、G α ポリペプチドをコードするDNAは、2つの別個の発現ベクター上に担持されて宿主細胞に共トランスフェクトされてもよいし、あるいは、1つのベクター上に、ジシストロニックもしくはモノシストロニックに挿入されて、宿主細胞内に導入されてもよい。

【0083】

宿主細胞は、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター等の哺乳動物細胞であれば特に制限はない。具体的には、COP、L、C127、Sp2/0、NS-1、NIH3T3、ST2等のマウス由来細胞、ラット由来細胞、BHK、CHO等のハムスター由来細胞、COS1、COS3、COS7、CV1、Vero等のサル由来細胞、およびHeLa、293等のヒト由来細胞などが例示される。

【0084】

宿主細胞への遺伝子導入は、哺乳動物細胞の遺伝子導入に使用できる公知のいかなる方法を用いて行ってもよく、例えば、リン酸カルシウム共沈殿法、エレクトロポレーション法、リボソーム法、マイクロインジェクション法等が挙げられ

る。

【0085】

遺伝子を導入された宿主細胞は、例えば、約5～20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地(MEM)、ダルベッコ改変最少必須培地(DMEM)、RPMI1640培地、199培地等を用いて培養することができる。培地のpHは約6～約8であるのが好ましく、培養温度は、通常約30～約40℃である。

【0086】

上記のようにして得られる、GPCR5D蛋白質又はその均等物をコードするDNA及びG α ポリペプチドをコードするDNAを導入された動物細胞は、使用するスクリーニング法に応じてそのまま無傷細胞として使用してもよいし、あるいは適当な緩衝液中で該細胞を破碎して得られる細胞ホモジネートや、該ホモジネートを適当な条件で遠心分離するなどして(例えば、約1,000×g程度で遠心して上清を回収した後、約100,000×g程度で遠心して沈渣を回収する)単離される膜面分の形態であってもよい。

【0087】

例えば、GTP γ S結合アッセイや、効果器の活性を直接測定することにより、被験物質のリガンド特性を評価する場合には、使用するスクリーニング系は、好ましくは、上記のようにして細胞から調製される膜面分である。一方、細胞内cAMP量(もしくはcAMP応答性リポーターの発現量)や細胞内Ca²⁺量(もしくはCa²⁺応答性リポーターの発現量)を測定することにより、被験物質のリガンド特性を評価する場合には、使用するスクリーニング系は無傷動物細胞である。

【0088】

尚、リガンド活性の評価を、cAMP応答性リポーター(効果器がアデニル酸シクラーゼの場合)もしくはCa²⁺応答性リポーター(効果器がホスホリパーゼCの場合)の発現量を指標として行う場合には、宿主動物細胞は、cAMP応答エレメント(CRE)またはTPA応答エレメント(TRE)を含むプロモーター領域の下流にリポーター蛋白質をコードするDNAが機能的に連結した発現カセットを含むベクターを導入されたものである必要がある。CREはcAMPの

存在下に遺伝子の転写を活性化するシスエレメントであり、コンセンサス配列としてTGACGTCAを含む配列が挙げられるが、cAMP応答性を保持する限り当該配列の一部に欠失、置換、挿入または付加を含む配列であってもよい。一方、TREは Ca^{2+} の存在下に遺伝子の転写を活性化するシスエレメントであり、コンセンサス配列としてTGACTCAを含む配列が挙げられるが、 Ca^{2+} 応答性を保持する限り当該配列の一部に欠失、置換、挿入または付加を含む配列であってもよい。CRE又はTREを含むプロモーター配列としては、上記のようなウイルスプロモーターや哺乳動物の構成蛋白質遺伝子プロモーターが同様に使用可能であり、制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、あるいはPCR等を利用して、該プロモーター配列の下流にCREまたはTRE配列を挿入することができる。CRE又はTREの制御下におかれるリポーター遺伝子としては、迅速且つ簡便に遺伝子発現を検出・定量できる公知のいかなる遺伝子を使用してもよく、例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ等のリポーター蛋白質をコードするDNAが挙げられるが、これらに限定されない。リポーター遺伝子の下流にはターミネーター配列が配置されることがより好ましい。このようなCRE（又はTRE）-リポーター発現カセットを担持するベクターとしては、公知のプラスミドベクター又はウイルスベクターを使用することができる。

【0089】

本発明のスクリーニング系の1構成単位である、GPCR5D蛋白質又はその均等物を含む脂質二重層膜及び $G\alpha$ ポリペプチドを必須構成要素として含有する系の別の好ましい実施態様は、GPCR5D蛋白質又はその均等物のC末端側に、あるファミリーに属する $G\alpha$ のRB領域及び任意の $G\alpha$ のGB領域を少なくとも含むポリペプチドが連結した融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターでトランスフェクトした宿主動物細胞、該細胞のホモジネートまたは該細胞由来の膜画分である。

【0090】

GPCR5D蛋白質又はその均等物をコードするDNA、並びに各ファミリーの $G\alpha$ のRB結合領域及び任意の $G\alpha$ のGB領域を含むポリペプチドをコードす

るDNAは、上述のようにして取得することができる。当業者は、これらのDNA配列をもとにして、公知の遺伝子工学的手法を適宜組み合わせることにより、GPCR5DとG α ポリペプチドとの融合蛋白質をコードするDNAを構築することができる。例えば、PCR等を用いてGPCR5DをコードするDNAの終始コドンを除いたものに、G α ポリペプチドをコードするDNAを読み枠が合うように、DNAリガーゼを用いてライゲーションする等の方法が挙げられる。この際、GPCR5DのC末端の一部を欠失させたり、GPCR5DとG α との間にHis-tag等のリンカー配列を挿入したりすることもできる。

【0091】

得られた融合蛋白質をコードするDNAは、上述のような発現ベクター中に挿入され、宿主哺乳動物細胞に上記の遺伝子導入技術を用いて導入される。得られた動物細胞の膜上に当該融合蛋白質が発現すると、受容体の細胞内第3ループ上のG α 活性化ドメインとG α のRB領域とは、GPCR5Dに対する生理的リガンドの非存在下に相互作用して、G α におけるGDP・GTP交換反応を促進し得る。従って、G α は恒常的に活性化された状態となる。

【0092】

あるいは、G α をコードするDNAの特定の部分に公知の手法により変異を導入して、そのアミノ酸配列を改変することによっても、G α が恒常的に活性化された状態となることが知られている。従って、この系もリガンドのスクリーニングに同様に用いることができる。このような技術は、例えば、Mol. Pharmacol., 57, 890-898 (2000)やBiochemistry, 37, 8253-8261 (1998)に記載される方法に準じた内容で実施することができる。

【0093】

このような融合蛋白質（もしくは変異G α ）発現細胞についても、使用するスクリーニング法に応じて、無傷細胞、細胞ホモジネート、膜画分のいずれかの形態を適宜選択して用いることができる。

【0094】

本発明のさらに別の態様においては、GPCR5D蛋白質又はその均等物を含む脂質二重層膜、及びG α ポリペプチドを構成要素として含有するスクリーニン

グ系として、精製したGPRC5D蛋白質又はその均等物とG α ポリペプチド、あるいは精製した該受容体とG α との融合蛋白質を、人工脂質二重層膜中に再構成させたものを使用することができる。GPRC5D蛋白質又はその均等物は、ヒトもしくはマウス、又は他の哺乳動物の視床下部を含む脳神経組織等から得られる膜画分より、抗GPRC5D抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー等により精製することができる。あるいは、該受容体は、GPRC5D蛋白質又はその均等物をコードするDNAを含む発現ベクターを導入された組換え細胞から、抗GPRC5D抗体や、His-tag、GST-tag等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等により精製することもできる。同様に、該受容体とG α との融合蛋白質も、該融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターを導入された組換え細胞から、抗GPRC5D抗体や、His-tag、GST-tag等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等により精製することができる。

【0095】

人工脂質二重層膜を構成する脂質としては、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、コレステロール(Ch)、ホスファチジイルノシトール(PI)、ホスファチジリエタノールアミン(PE)等が挙げられ、これら1種または2種以上を適当な比率で混合したものが好ましく使用される。

【0096】

例えば、受容体とG α 、又は受容体-G α 融合蛋白質を組み込んだ人工脂質二重層膜(プロテオリポソーム)は、以下の方法により調製することができる。即ち、まず、PC:PI:Ch=12:12:1の混合脂質クロロホルム溶液を適当量ガラスチューブに分取し、窒素ガス蒸気でクロロホルムを蒸発させて脂質をフィルム状に乾燥させた後、適当な緩衝液を加えて懸濁、次いで超音波処理により均一に分散させ、コール酸ナトリウム等の界面活性剤を含む緩衝液をさらに加えて脂質を完全に懸濁する。ここに、精製した受容体とG α 、又は受容体-G α 融合蛋白質を適量添加し、氷中で時々攪拌しながら20~30分間程度インキュベートした後、適当な緩衝液に対して透析する。約100,000 $\times g$ で30~60分間遠心して沈渣を回収することにより、所望のプロテオリポソームを得ることができる。

【0097】

上記のようなスクリーニング系及びスクリーニング方法により選ばれた、拒食症又は生活習慣病に対する治療活性を有する物質は、任意の医薬上許容される担体を配合することにより拒食症又は生活習慣病の治療薬とすることができる。従って、本発明は、本発明のスクリーニング法により選抜されたGPRC5Dに対するアンタゴニスト又はインバースアゴニストを有効成分とする拒食症治療薬を提供する。本発明はまた、本発明のスクリーニング法により選抜されたGPRC5Dに対する生理的リガンド又はアゴニストを有効成分とする生活習慣病治療薬を提供する。

【0098】

医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコールスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0099】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量のリガン

ドを懸濁させた懸濁液剤、有効量のリガンドを溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

【0100】

非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。投与方法が視床下部付近への局所注入の場合、有効成分であるリガンドを人工脳髄液に溶解もしくは懸濁させた注射液剤が好ましい。あるいは、コラーゲン等の生体親和性の材料を用いて、徐放性製剤とすることもできる。プルーロニックゲルは体温でゲル化し、それ以下の低温では液体であることから、リガンドをプルーロニックゲルとともに局所注入して標的組織周辺でゲル化させることにより、長期持続性とすることができる。当該リガンド製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、リガンドおよび医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

【0101】

本発明のリガンド製剤の投与量は、リガンド活性（フルアゴニストか部分アゴニストか、あるいはアンタゴニストかインバースアゴニストか）、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、通常、成人1日あたりリガンド量として約0.0008～約2.5mg/kg、好ましくは約0.008～約0.025/kgである。

【0102】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0103】

参考例1：GPCR5D遺伝子の発現分布解析

db/dbマウス（雄、SPFグレード、購入時7週齢、臓器採取時10週齢、日本クレア）視床下部をTrizol (Gibco) 中にホモジナイズし、全RNAを採取した。全RNA 1 μ gを鋳型に、RNA PCR Kit (AMV) Ver2.1. (Takara) を用いてcDNAを合成した。この視床下部cDNAを鋳型とし、以下のマウスGPRC5D (mGprc5d) 特異的プライマーを用いてPCRを行った。尚、Taqポリメラーゼはパーキンエルマー社のものを用いた。

5' -ACC TCT TCT GTG ACA ACG AG- 3' (配列番号5)

5' -GGA AGA GGA CAT AGA TCA GG- 3' (配列番号6)

その結果、db/dbマウスの視床下部においてGPRC5D遺伝子が発現していることが明らかとなった。

【0104】

実施例1：肥満モデルマウスに対するGPRC5DクローンアンチセンスDNAの作用

(1) 実験材料

試薬：GPRC5DクローンアンチセンスDNAは、当該遺伝子開始コドン付近に対する25merのチオール化アンチセンスDNAを用いた。以下に該アンチセンスDNAの塩基配列を示す。

5' -TCA TAC ATG GTG ACT TAT AGG TAG A- 3' (配列番号7)

コントロールDNAとしては、下記配列を有するチオール化オリゴDNAを使用した。

5' -CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A- 3' (配列番号8)

この配列は、ヘモグロビン異常症サラセミアにおける赤血球 β -グロビンのプレmRNA中、705位でのスプライシング異常を引き起こす変異により生じた配列に対して相補的である。このオリゴ鎖は、健常細胞では特異的標的部位や生物学的活性を有しておらず、サラセミアの赤血球細胞に作用させたときにのみ該スプライシング異常を訂正し、その結果、正常 β -グロビンをコードするmRNAを生じさせるとされている。これらのオリゴDNAの合成、チオール化及びHPLC精製は、いずれも(株)日本バイオサービスに委託した。

その他試薬は市販の特級試薬を用いた。

実験動物：C57BL db/db（以下、肥満マウスという）（SPF規格）を日本クレア社より購入、予備飼育の後、肥満マウスは10週齢で実験に使用した。

飼育環境：温度が20℃以上26℃以下、相対湿度が30%以上70%以下に制御され、照明が8:00～20:00点灯、20:00～8:00消灯のサイクルに設定された部屋で飼育した。飼育中は固形飼料（CE-2，日本クレア）および滅菌蒸留水を自由摂取させた。

【0105】

（2）投与液の調製

アンチセンスDNA投与液、コントロールDNA投与液として、 $7.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のアンチセンスDNAを含む人工脳髄液（ 0.166 g/L CaCl_2 、 7.014 g/L NaCl 、 0.298 g/L KCl 、 $0.203 \text{ g/L MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 2.10 g/L NaHCO_3 ）を調製した。

【0106】

（3）アンチセンスDNAの脳室内投与

肥満マウスを2群に分け、一晚絶食の後、午前8:00に照明点灯と同時に、1群にアンチセンスDNA投与液を $4 \mu\text{l}/\text{マウス}$ （アンチセンスDNAとして $30 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）を、もう一群にはコントロールDNA投与液 $4 \mu\text{l}/\text{マウス}$ を側脳室内に投与した。

【0107】

（4）アンチセンスDNA投与によるマウスの摂餌量、血糖値に対する影響

投与直後よりマウスへの給餌を再開し、投与後48時間まで12時間毎に摂餌量を算出した。肥満マウスの摂餌量に対するアンチセンスDNAの作用を図1に示す。図1において、黒色のカラムはコントロールDNA投与群、白色のカラムはアンチセンスDNA投与群の、投与後12時間毎の平均摂餌量（エラーバーは標準偏差、コントロールDNA投与群 $n=4$ 、アンチセンスDNA投与群 $n=4$ ）を示す。投与後12時間では摂餌量に大きな変化は認められなかった。しかし、その後の経過と共にGPCR5DクローンのアンチセンスDNA投与により、肥満マウスの摂餌量を上昇させる効果が見られた。

また、投与前および投与後48時間まで24時間毎に血糖値を測定した。肥満マウスの血糖値に対するアンチセンスDNAの作用を図2に示す。図2において、黒色のカラムはコントロールDNA投与群、白色のカラムはアンチセンスDNA投与液群の、投与後24時間毎の平均血糖値（エラーバーは標準偏差、コントロールDNA投与群 $n=4$ 、アンチセンスDNA投与群 $n=4$ ）を示す。投与後24時間までは大きな変化は認められなかった。しかし、投与後48時間でGPRC5DクローンのアンチセンスDNA投与により、肥満マウスの血糖値を上昇させる効果が見られた。

上記の結果から、GPRC5Dクローンは摂食行動および糖代謝に関与する因子である可能性が示唆された。

【0108】

実施例3：飽食・絶食状態での視床下部遺伝子発現変動の解析

db/dbマウス（雄、SPFグレード、購入時7週齢、臓器採取時11週齢、日本クレア；以下、肥満マウスという）およびC57BL/6Nマウス（雄、SPFグレード、購入時6週齢、臓器採取時11週齢、日本チャールズ・リバー；以下、正常マウスという）の視床下部を飽食状態および24時間絶食状態で採取し、Trizol (Gibco) 中にてホモジナイズし、全RNAを採取した。全RNA $1 \mu\text{g}$ をSYBR Green RT-PCR Reagent (Roche) を用いて、逆転写反応を行った。続いて、逆転写反応済みの各サンプルとGPRC5Dクローン特異的なプライマー（下記参照）を混合し、ABI7700 sequence detector (PE biosystems) を用いてPCR反応を実施し、GPRC5Dクローンの遺伝子発現変動を解析した。またGPRC5Dクローンの発現は、GAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）にて補正を行い、相対値として解析した。

・GPRC5D

フォワードプライマー：

5' -GGA GTA TCT CAT CCC ATC AGC TAC A- 3' （配列番号9）

リバースプライマー：

5' -CAC TCT TCC AGG TTG TCT CTA TGC- 3' （配列番号10）

・GAPDH

フォワードプライマー：

5' -CAA GAG AGG CCC TAT CCC AAC T- 3' (配列番号 11)

リバースプライマー：

5' -CTA GGC CCC TCC TGT TAT TAT GG- 3' (配列番号 12)

【0109】

GPRC5D 遺伝子の飽食／絶食状態での発現変動を図3に示す。図3において、黒色のカラムは飽食状態、白色のカラムは絶食状態のGPRC5D 遺伝子の平均発現変動（エラーバーは標準偏差、各群 $n = 3$ ）を示す。正常マウスでは大きな変動は認められなかったが、肥満マウスでは、絶食によりGPRC5D の発現亢進が認められた。肥満マウスの絶食状態でGPRC5D クローン発現が亢進していること、並びにアンチセンス投与が摂食亢進、血糖上昇作用を示すことから、GPRC5D クローンは摂食抑制作用を有する可能性が示唆された。以上のことより、GPRC5D クローンは摂餌量および糖代謝の調節に関与しており、GPRC5D クローンの作用を亢進することは、より効果的な生活習慣病治療効果が得られることが明らかになった。

【0110】

実験例4：GPRC5D クローン安定発現株の樹立

(1) 導入遺伝子ベクターの構築

GPRC5D クローンのコード領域をKOD-Plus (TOYOBO) にてPCR法で増幅する。増幅した遺伝子断片をpcDNA3.1 (Invitrogen) に挿入し、GPRC5D 発現ベクターを構築する。

【0111】

(2) 細胞株の樹立

以下の3つのタイプのキメラG蛋白質 (Gq、Gq15、Gqs5) 発現CHO細胞株 (Molecular Devices) を 10 cm^2 培養皿に播種し、10% FBS (Gibco) を含むD-MEM培地 (Gibco) 中で60～70%コンフルエントになるまで培養する。その後無血清培地に転換し、上記(1)で構築したGPRC5D 発現ベクターとLipofectamine-Plus (Gibco) と複合体を形成させ培地に添加する。5時間インキュベート後10% FBSを含むD-MEM培地に転換後さらに8時

間培養する。その後トリプシン－EDTAで細胞を培養皿から剥離させ、500 μ g/mlのG418と10% FBSを含むD-MEM培地に懸濁し、10 cm²培養皿に播種する。数日後に形成されたコロニーを単離し、GPCR5D安定発現株 (¥q、¥qi5、¥qS5) とする。

【0112】

実験例5：レセプターアゴニストのスクリーニング

(1) 細胞の調整

GPCR5D安定発現株 (¥q、¥qi5、¥qS5) を96穴培養皿に播種し、10% FBS (Gibco) を含むD-MEM培地 (Gibco) 中で60～70%コンフルエントになるまで培養する。これを発現細胞として使用する。

【0113】

(2) 薬物添加

発現細胞の培地を使用前日に無血清のD-MEM培地に交換する。評価日に各化合物 (2.5 mM DMSO溶液) をD-MEM培地で目的の濃度になるように希釈する。培養皿の培地を除去し、希釈した被験化合物と4 μ MのFluo3AM (Teflab.) 及び2.5 mMのprobenecidを添加し、37℃で60分培養する。被験化合物を添加しない以外は同様に処理したサンプルを、比較のために用意する。

【0114】

(3) FLIPR法による細胞内カルシウム濃度測定

上記の処理を施した細胞を氷冷したPBSで洗浄し、Thyrode's medium (2.5 mMのprobenecid、1%ゼラチンを含む) に懸濁する。培養皿の488 nM、540 nMでの吸収をFLIPR (Molecular Devices) にて定量する。

【0115】

【発明の効果】

GPCR5Dは摂食行動に関与するGPCRであることから、GPCR5Dの発現もしくは機能を増強もしくは抑制する物質を有効成分とする本発明の医薬組成物は、摂食量を所望の値に調節することが可能であり、それによって糖尿病、肥満症、高脂血症等の過食に起因する生活習慣病、あるいは拒食症の治療に効果を発揮することが期待される。また、本発明のスクリーニング系及びスクリーニ

ング方法によれば、GPRC5Dのリガンドを容易に且つ迅速にスクリーニングすることができ、GPRC5Dをターゲットとした新薬の開発、さらには疾患マーカーの探索や、当該疾患マーカーを用いた診断方法の確立に有用である。

【0116】

【配列表フリーテキスト】

配列番号5：GPRC5D mRNAを増幅するためのプライマーとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号6：GPRC5D mRNAを増幅するためのプライマーとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号7：GPRC5Dの発現を阻害するアンチセンスDNAとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号8：サラセミアにおける β -グロビン プレ mRNAの705位でのスプライシング異常を引き起こす変異により生じた配列に対するアンチセンスDNAとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号9：GPRC5D mRNAを増幅するためのプライマーとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号10：GPRC5D mRNAを増幅するためのプライマーとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号11：GAPDH mRNAを増幅するためのプライマーとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

配列番号12：GAPDH mRNAを増幅するためのプライマーとして機能すべくデザインされたオリゴヌクレオチド。

【0117】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals

<120> Therapeutic Agent for Anorexia Nervosa or Life-Style Related

Diseases, and Method for Screening Same

<130> A5309

<160> 12

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1038

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1035)

<400> 1

aug uac aag gac ugc auc gag ucc acu gga gac uau uuu cuu cuc ugu	48
Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Leu Cys	
1 5 10 15	
gac gcc gag ggg cca ugg ggc auc auu cug gag ucc cug gcc aua cuu	96
Asp Ala Glu Gly Pro Trp Gly Ile Ile Leu Glu Ser Leu Ala Ile Leu	
20 25 30	
ggc auc gug guc aca auu cug cua cuc uua gca uuu cuc uuc cuc aug	144
Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met	
35 40 45	
cga aag auc caa gac ugc agc cag ugg aa u guc cuc ccc acc cag cuc	192
Arg Lys Ile Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Leu	

50	55	60	
cuc uuc cuc cug agu guc cug ggg cuc uuc gga cuc gcu uuu gcc uuc			240
Leu Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Phe Ala Phe			
65	70	75	80
auc auc gag cuc aaU caa caa acu gcc ccc gua cgc uac uuu cuc uuu			288
Ile Ile Glu Leu Asn Gln Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe			
85	90	95	
ggg guu cuc uuu gcu cuc ugu uuc uca ugc cuc uua gcu cau gcc ucc			336
Gly Val Leu Phe Ala Leu Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser			
100	105	110	
aaU cua gug aag cug guu cgg ggu ugu guc ucc uuc ucc ugg acg aca			384
Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Cys Val Ser Phe Ser Trp Thr Thr			
115	120	125	
auu cug ugc auu gcu auu ggu ugc agu cug uug caa auc auu auu gcc			432
Ile Leu Cys Ile Ala Ile Gly Cys Ser Leu Leu Gln Ile Ile Ile Ala			
130	135	140	
acu gag uau gug acu cuc auc aug acc aga ggu aug aug uuu gug aaU			480
Thr Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Met Met Phe Val Asn			
145	150	155	160
aug aca ccc ugc cag cuc aaU gug gac uuu guu gua cuc cug guc uau			528
Met Thr Pro Cys Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Val Leu Leu Val Tyr			
165	170	175	
guc cuc uuc cug aug gcc cuc aca uuc uuc guc ucc aaa gcc acc uuc			576
Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe			
180	185	190	
ugu ggc ccg ugu gag aac ugg aag cag cau gga agg cuc auc uuu auc			624
Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ile			
195	200	205	
acu gug cuc uuc ucc auc auc auc ugg gug gug ugg auc ucc aug cuc			672

Thr Val Leu Phe Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu	
210	215 220
cug aga ggc aac ccg cag uuc cag cga cag ccc cag ugg gac gac ccg	720
Leu Arg Gly Asn Pro Gln Phe Gln Arg Gln Pro Gln Trp Asp Asp Pro	
225 230 235 240	
guc guc ugc auu gcu cug guc acc aac gca ugg guu uuc cug cug cug	768
Val Val Cys Ile Ala Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Leu	
245 250 255	
uac auc guc ccu gag cuc ugc auu cuc uac aga ucg ugu aga cag gag	816
Tyr Ile Val Pro Glu Leu Cys Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu	
260 265 270	
ugc ccu uua caa ggc aaU gcc ugc ccc guc aca gcc uac caa cac agc	864
Cys Pro Leu Gln Gly Asn Ala Cys Pro Val Thr Ala Tyr Gln His Ser	
275 280 285	
uuc caa gug gag aac cag gag cuc ucc aga gcc cga gac agu gau gga	912
Phe Gln Val Glu Asn Gln Glu Leu Ser Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly	
290 295 300	
gcu gag gag gau gua gca uua acu uca uau ggu acu ccc auu cag ccg	960
Ala Glu Glu Asp Val Ala Leu Thr Ser Tyr Gly Thr Pro Ile Gln Pro	
305 310 315 320	
cag acu guu gau ccc aca caa gag ugu uuc auc cca cag gcu aaa cua	1008
Gln Thr Val Asp Pro Thr Gln Glu Cys Phe Ile Pro Gln Ala Lys Leu	
325 330 335	
agc ccc cag caa gau gca gga gga gua uaa	1038
Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Gly Val	
340 345	

<210> 2

<211> 345

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Leu Cys

1 5 10 15

Asp Ala Glu Gly Pro Trp Gly Ile Ile Leu Glu Ser Leu Ala Ile Leu

20 25 30

Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met

35 40 45

Arg Lys Ile Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Leu

50 55 60

Leu Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Phe Ala Phe

65 70 75 80

Ile Ile Glu Leu Asn Gln Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe

85 90 95

Gly Val Leu Phe Ala Leu Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser

100 105 110

Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Cys Val Ser Phe Ser Trp Thr Thr

115 120 125

Ile Leu Cys Ile Ala Ile Gly Cys Ser Leu Leu Gln Ile Ile Ile Ala

130

135

140

Thr Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Met Met Phe Val Asn

145

150

155

160

Met Thr Pro Cys Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Val Leu Leu Val Tyr

165

170

175

Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe

180

185

190

Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ile

195

200

205

Thr Val Leu Phe Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu

210

215

220

Leu Arg Gly Asn Pro Gln Phe Gln Arg Gln Pro Gln Trp Asp Asp Pro

225

230

235

240

Val Val Cys Ile Ala Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Leu

245

250

255

Tyr Ile Val Pro Glu Leu Cys Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu

260

265

270

Cys Pro Leu Gln Gly Asn Ala Cys Pro Val Thr Ala Tyr Gln His Ser

275

280

285

Phe Gln Val Glu Asn Gln Glu Leu Ser Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly
 290 295 300

Ala Glu Glu Asp Val Ala Leu Thr Ser Tyr Gly Thr Pro Ile Gln Pro
 305 310 315 320

Gln Thr Val Asp Pro Thr Gln Glu Cys Phe Ile Pro Gln Ala Lys Leu
 325 330 335

Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Gly Val
 340 345

<210> 3

<211> 1324

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (148)..(1047)

<400> 3

gaggagagau uaaagcaccu gaaguugucu ccuccuacu cauugcagc cacagcuucc 60

ccaccagcac agccucagag gcuuccggag uagacucgga ggaggagacc agacaucggu 120

ucucgugagg ucuaccuaua agucacc aug uau gag gac ugc gug aag ucc aca 174

Met Tyr Glu Asp Cys Val Lys Ser Thr

1

5

gaa gac uau uac cuc uuc ugu gac aac gag ggg cca ugg gcc auu guu	222
Glu Asp Tyr Tyr Leu Phe Cys Asp Asn Glu Gly Pro Trp Ala Ile Val	
10 15 20 25	
cug gag ucc uug gca gug auu ggc aua gug guu acc aua uug cua cuc	270
Leu Glu Ser Leu Ala Val Ile Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu	
30 35 40	
cug gca uuu cug uuc cuc aug cgg aag guu cag gac ugc agc cag ugg	318
Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met Arg Lys Val Gln Asp Cys Ser Gln Trp	
45 50 55	
aac gug cuu ccc acu cag uuc cuc uuc cug cug gcu gug cuc ggg cuc	366
Asn Val Leu Pro Thr Gln Phe Leu Phe Leu Leu Ala Val Leu Gly Leu	
60 65 70	
uuc gga cuu acu uuu gcc uuc auc auc caa cuc aac cau caa acu gcc	414
Phe Gly Leu Thr Phe Ala Phe Ile Ile Gln Leu Asn His Gln Thr Ala	
75 80 85	
ccu guu cgc uac uuc cuc uuu ggg guu cuc uuu gcu auc ugc uuc ucc	462
Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe Gly Val Leu Phe Ala Ile Cys Phe Ser	
90 95 100 105	
ugc cuc cug gcu cau gcc ucc aac cug gug aag cug guc cgg ggu aga	510
Cys Leu Leu Ala His Ala Ser Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Arg	
110 115 120	
guc ucc uuc ugc ugg aca aca auu cug uuc auu gcu auc ggu guc agc	558
Val Ser Phe Cys Trp Thr Thr Ile Leu Phe Ile Ala Ile Gly Val Ser	
125 130 135	
cug uug cag acc auc auu gcg aua gag uau gug acc cuc auc aug acc	606
Leu Leu Gln Thr Ile Ile Ala Ile Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr	
140 145 150	
aga ggc uug aug uuc gag cau aug aca ccg uau cag cuc aa uug gac	654
Arg Gly Leu Met Phe Glu His Met Thr Pro Tyr Gln Leu Asn Val Asp	

155	160	165	
uuu guc ugu cuc cug auc uau guc cuc uuc cug aug gcc cuc acu uuc			702
Phe Val Cys Leu Leu Ile Tyr Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe			
170	175	180	185
uuc guc ucc aag gcc acc uuc ugu ggc cca ugu gag aac ugg aaa cag			750
Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln			
	190	195	200
cac gga agg cuc aua uuu gcu acu gug cug guc ucu auc auu auc ugg			798
His Gly Arg Leu Ile Phe Ala Thr Val Leu Val Ser Ile Ile Ile Trp			
	205	210	215
gug gug ugg auc ucc aug cuc uug aga ggc aac ccc cag cuc cag cga			846
Val Val Trp Ile Ser Met Leu Leu Arg Gly Asn Pro Gln Leu Gln Arg			
	220	225	230
cag ccc cac ugg gac gau gca guc auc ugc auu ggc cug guc acc aac			894
Gln Pro His Trp Asp Asp Ala Val Ile Cys Ile Gly Leu Val Thr Asn			
	235	240	245
gcu ugg guc uuc cug cug auc uac auc auc ccu gag cug agc aua cuc			942
Ala Trp Val Phe Leu Leu Ile Tyr Ile Ile Pro Glu Leu Ser Ile Leu			
	250	255	260
			265
uac agg uca ugu agg cag gag ugu ccu aca caa ggc aac guc ugc cag			990
Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu Cys Pro Thr Gln Gly Asn Val Cys Gln			
	270	275	280
guc ccu guc uac caa cgc agc uuc agg aug gau acc cag gaa ccc acc			1038
Val Pro Val Tyr Gln Arg Ser Phe Arg Met Asp Thr Gln Glu Pro Thr			

285

290

295

aga gag ugc ugaucacagc cgggagauac ucaucccauc agcuacacua 1087

Arg Glu Cys

300

agcccacagc aagaugcagg auuguaaagc uacuggaaac agcauagaga caaccuggaa 1147

gagugcccug cuccacacag ccuaaaagag cccaggggag cacuggacac acugucaaug 1207

aagcauccuu ccuguccuu ccucucuguu ucccugcccu uuccacucuu cuggacceag 1267

ccucugaaga cugucauguc cugcacaauu aaaaucuuu ugccaccua aaaaaaa 1324

<210> 4

<211> 300

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Tyr Glu Asp Cys Val Lys Ser Thr Glu Asp Tyr Tyr Leu Phe Cys

1

5

10

15

Asp Asn Glu Gly Pro Trp Ala Ile Val Leu Glu Ser Leu Ala Val Ile

20

25

30

Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met

35

40

45

Arg Lys Val Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Phe

50

55

60

Leu Phe Leu Leu Ala Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Thr Phe Ala Phe
65 70 75 80

Ile Ile Gln Leu Asn His Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe
85 90 95

Gly Val Leu Phe Ala Ile Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser
100 105 110

Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Arg Val Ser Phe Cys Trp Thr Thr
115 120 125

Ile Leu Phe Ile Ala Ile Gly Val Ser Leu Leu Gln Thr Ile Ile Ala
130 135 140

Ile Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Leu Met Phe Glu His
145 150 155 160

Met Thr Pro Tyr Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Cys Leu Leu Ile Tyr
165 170 175

Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe
180 185 190

Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ala
195 200 205

Thr Val Leu Val Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu

210

215

220

Leu Arg Gly Asn Pro Gln Leu Gln Arg Gln Pro His Trp Asp Asp Ala

225

230

235

240

Val Ile Cys Ile Gly Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Ile

245

250

255

Tyr Ile Ile Pro Glu Leu Ser Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu

260

265

270

Cys Pro Thr Gln Gly Asn Val Cys Gln Val Pro Val Tyr Gln Arg Ser

275

280

285

Phe Arg Met Asp Thr Gln Glu Pro Thr Arg Glu Cys

290

295

300

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying GPRC5D

mRNA.

<400> 5

acctcttctg tgacaacgag

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying GPRC5D mRNA.

<400> 6

ggaagaggac atagatcagg

20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense DNA for inhibiting expression of GPRC5D.

<400> 7

tcatacatgg tgacttatag gtaga

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense DNA for sequence
resulted from mutation causing abnormal splicing at position 705
of (-globin pre-mRNA in thalassemia.

<400> 8

cctcttacct cagttacaat ttata

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying GPRC5D
mRNA.

<400> 9

ggagtatctc atcccatcag ctaca

25

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying GPRC5D mRNA.

<400> 10

cactcttcca ggttgtctct atgc

24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying GAPDH mRNA.

<400> 11.

caagagaggc cctatcccaa ct

22

<210> 12

<211> 23.

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Oligonucleotide to designed to act as primer for amlifying GAPDH mRNA.

<400> 12

ctaggcccct cctgttatta tgg

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

肥満マウスの摂餌量に及ぼすGPRC5DのアンチセンスDNA投与の効果（投与直後～48時間後）を示す図である。黒色のカラムはコントロールDNA投与群、白色のカラムはアンチセンスDNA投与群における摂餌量（平均±標準偏差、コントロールDNA投与群n=4、アンチセンスDNA投与群n=4）をそれぞれ示している。図中の*は両群間に有意な差があることを示している（ $p < 0.05$ 、Studentのt検定）。

【図 2】

肥満マウスの血糖値に及ぼすGPRC5DのアンチセンスDNA投与の効果（投与直後～48時間後）を示す図である。黒色のカラムはコントロールDNA投与群、白色のカラムはアンチセンスDNA投与群における血糖値（平均±標準偏差、コントロールDNA投与群n=4、アンチセンスDNA投与群n=4）をそ

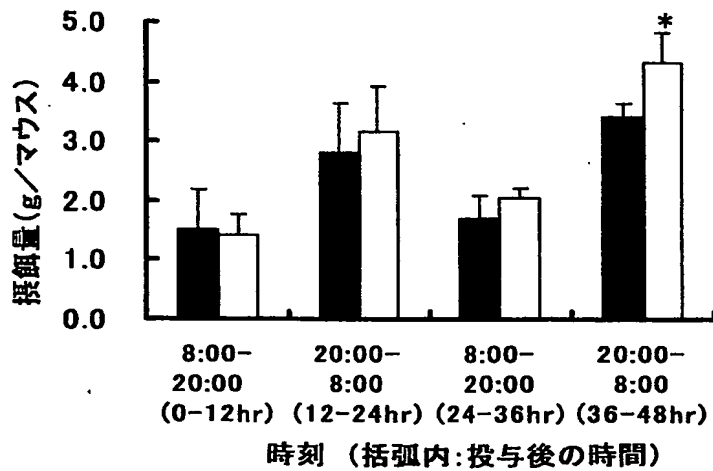
れぞれ示している。図中の*は両群間に有意な差があることを示している ($p < 0.05$, Studentのt検定)。

【図3】

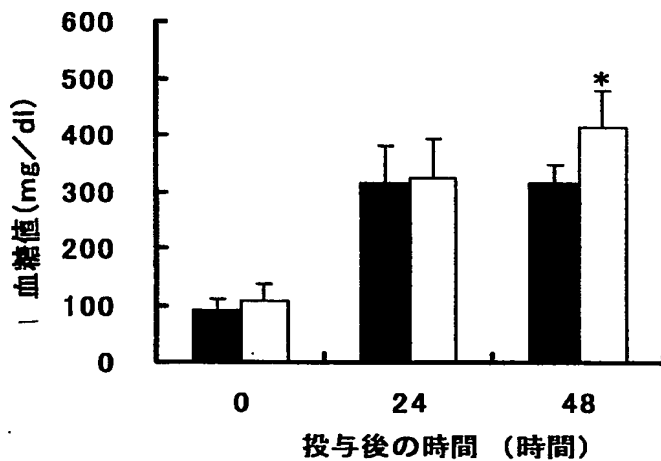
正常マウスおよび肥満マウスにおけるGPRC5D遺伝子の飽食および絶食状態での発現変動を示す図である。黒色のカラムは飽食時、白色のカラムは絶食時におけるGPRC5D/GAPDH比(平均±標準偏差、各群 $n=3$)をそれぞれ示している。

【書類名】 図面

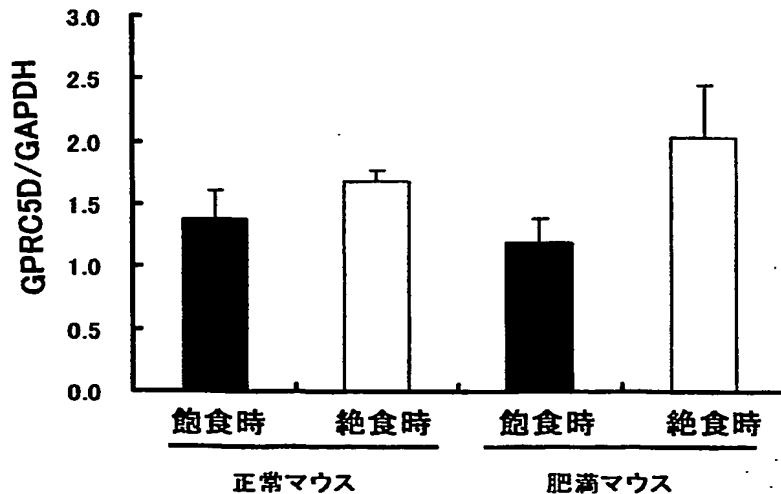
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 摂食量のコントロールが良好な新規生活習慣病治療薬又は拒食症治療薬、並びにそのスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 視床下部で発現するGPCR、GPCR5Dの発現もしくは機能を抑制する物質を有効成分とする拒食症治療薬、該受容体の発現もしくは機能を増強する物質を有効成分とする生活習慣病治療薬。GPCR5Dと各種G蛋白質の共発現系のシリーズからなるスクリーニング系を用いることによる、生活習慣病又は拒食症に対して治療活性を有する物質のスクリーニング方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日	1990年 8月 9日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名	住友製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.